烟蚜若蚜及有翅和无翅成蚜转录组及翅型相关基因的表达差异分析

张 超[1]，杨 洪[1,2,*]，杨茂发[1,2]，喻会平[3]，代园凤[3]

（1. 贵州大学昆虫研究所，贵阳 550025；2. 贵州大学烟草学院，贵阳 550025；
3. 贵州省烟草公司毕节市公司，贵州毕节 551700）

摘要：【目的】旨在了解烟蚜 *Myzus persicae* 不同翅型（有翅和无翅）的转录组特征，丰富烟蚜转录组数据信息，为探明烟蚜翅型分化的分子机制打下基础。【方法】利用高通量测序技术 Illumina HiSeq™2000 分别检测烟蚜若蚜、无翅成蚜和有翅成蚜转录组表达差异；通过实时荧光定量 PCR（qPCR）方法，分析翅型相关基因表达模式。【结果】经过测序获得质量值高于 20 的碱基比例（Q20）均不低于 94% 的数据（GenBank 登录号：SRR6112438，SRR6112436 和 SRR6112437）；所有 reads 组装成 128 065 个 unigenes，平均长度 607.08 bp；将所得序列注释到 NR，NT，KOG，GO 和 KEGG 等数据库进行比对，共有 128 065 个 unigenes 被注释。基因表达分析发现，与无翅成蚜和若蚜两者相比，有翅成蚜翅形成、肽类激素和受体蛋白相关基因的表达量存在显著差异，表明这些差异表达基因在烟蚜生长发育过程中和烟蚜翅的形成有关。qPCR 分析结果显示，在有翅成蚜与无翅成蚜中，*Bursicon*（*bur-α* 和 *bur-β*），*flightin*（*Fln*），*Wntless*（*Wnt*），*Distal-less*（*Dll*），*Decapentaplegic*（*Dpp*），Juvenile hormone epoxide hydrolase 基因（*JHEH*）和 Ecdysone receptor 基因（*EcR*）表达量存在显著差异，表明这些基因可能与翅型发育有关。【结论】烟蚜翅形成的过程中体内 *bur-α* 和 *bur-β*，*Fln*，*Wnt*，*Dll*，*Dpp*，*JHEH* 和 *EcR* 基因表达发生了变化。该研究结果揭示了烟蚜翅形成相关基因的总体表达特征，为进一步深入开展烟蚜翅形成的研究奠定基础。

关键词：烟蚜；转录组；翅型发育；差异表达基因；高通量测序

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2018)02-0156-12

Differences in transcriptome and the expression of wing type related genes in nymphs and winged and apterous adults of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)

ZHANG Chao[1], YANG Hong[1,2,*], YANG Mao-Fa[1,2], YU Hui-Ping[3], DAI Yuan-Feng[3] (1. Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. College of Tobacco Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. Bijie Branch of Guizhou Tobacco Corporation, Bijie, Guizhou 551700, China)

Abstract: 【Aim】This study aims to understand the transcriptome features of *Myzus persicae* of different wing types (winged and apterous), to enrich its transcriptome data, and to reveal the molecular mechanisms of wing dimorphism of this insect. 【Methods】The differences in transcriptome expression

基金项目：贵州省烟草公司毕节市公司科技项目：毕节市烟蚜捕食性天敌生防体系的构建与应用（[2016]82）；贵州省烟草公司科技项目：烟蚜优效捕食性天敌应用技术研究（[2015]11）；贵州大学研究生创新基金（研农 2017018）；昆虫进化生物学和害虫控制国际科技合作基地（黔科合平台人才【2016】5802）

作者简介：张超，男，1992 年生，硕士研究生，研究方向为昆虫生态与害虫综合治理，E-mail：zc0178sfp@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: agr.hyang@gzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-08-18；接受日期 Accepted: 2017-10-27

between nymphs, apterous adults, and winged adults of *M. persicae* were detected by high-throughput sequencing technology Illumina HiSeq^{TM} 2000. The expression patterns of wing type related genes were analyzed by real-time quantitative PCR (qPCR). 【Results】The percentage of nucleotides with the quality score over 20 was not less than 94% (GenBank accession numbers: SRR6112438, SRR6112436 and SRR6112437). All reads were assembled into 128 065 unigenes with an average length of 607.08 bp. The resulting sequences were annotated to databases NR, NT, KOG, GO, KEGG, *etc.*, and a total of 128 065 unigenes were annotated. Gene expression analysis showed that the genes of flight proteins, peptide hormones, receptor proteins, *etc.*, which are related to wing formation during growth, were differentially expressed between winged adults and apterous adults or nymphs. qPCR analysis showed that there were significant differences in the expression levels of wing type differentiation related genes including *Bursicon* (*bur-α* and *bur-β*), *flightin* (*Fln*), *Wntless* (*Wnt*), *Distal-less* (*Dll*), *Decapentaplegic* (*Dpp*), juvenile hormone epoxide hydrolase gene (*JHEH*) and ecdysone receptor gene (*EcR*) between winged adults and apterous adults. 【Conclusion】The expression levels of *bur-α*, *bur-β*, *Fln*, *Wnt*, *Dll*, *Dpp*, *JHEH* and *EcR* change during wing formation in *M. persicae*. Our results show the general expression characteristics of wing formation genes and provide a basis for further research of wing formation in *M. persicae*.

Key words: *Myzus persicae*; transcriptome; wing development; differentially expressed gene; high-throughput sequencing

烟蚜 *Myzus persicae* 又名桃蚜，是一种危害性很大的农业害虫，它寄主广泛，除了危害烟草，同时也危害多种农作物。烟蚜不仅利用刺吸式口器吸取烟株汁液对烟株造成直接危害外，还可传播多种烟草病毒病，间接对烟草造成更严重的危害（秦焕菊和王桂芬，1996）。目前，在田间对烟蚜的综合治理以化学防治为主，但杀虫剂不合理使用和施药器械落后等原因使得烟蚜对杀虫剂长期处于高选择和高残留环境中，加上烟蚜具有较强的环境适应能力和较短的生活史，抗（耐）药性问题亦日趋严重（Devonshire *et al.*，1998），烟蚜的防治问题也日趋严峻。因而，寻找新型的防治技术防治烟蚜势在必行。

烟蚜是迁飞性昆虫，当周围环境不利于烟蚜的生存时，就会形成有翅型迁往适宜的生存环境（刘向东等，2004）。无翅烟蚜和有翅烟蚜作为两个不同形态的个体，其生长发育时期体内的生理状况也不一样（王凯等，2008）。在烟蚜在不同发育时期和有翅型烟蚜的发育过程中，其体内相关基因表达也会相应发生了变化，但对其差异基因表达及相关调控机理尚未进行深入研究。

近年来，随着高通量测序技术和转录组学的发展与不断完善（张棋麟和袁明龙，2013；胡俊杰等，2017），蚜虫转录组研究取得了一定的研究成果（Costechareyre *et al.*，2013；Anathakrishnan *et al.*，2014）。但关于烟蚜转录组研究报道较少，对烟蚜不同翅型的转录组表达信息的了解甚少，尤其是翅的形成及发育阶段。本研究拟通过转录组测序，获得烟蚜在不同虫态及翅型的转录组基本信息，并初步分析烟蚜若蚜、无翅成蚜和有翅成蚜的转录组信息，了解烟蚜在生长发育过程中特定基因的表达情况，为深入研究烟蚜翅型分化机制和相关基因克隆及功能分析奠定一定的基础。

1　材料与方法

1.1　供试虫源及饲养方法

供试虫源：烟蚜于 2008 年采自贵州省长顺县马路乡烟叶生产基地（26°03′N，106°45′E；海拔 1 280 m），在不接触任何药剂的情况下利用烟株连续饲养了 9 年。饲养条件：温度 25 ± 1℃，相对湿度 60% ~ 70%，光周期 14L∶10D。

1.2　主要试剂和仪器

Total RNA Extractor（Trizol）（Sangon Biotech，上海），Qubit2.0 RNA 检测试剂盒（Life，上海），VAHTS^{TM} mRNA-seq V2 Library Prep Kit for Illumina® 和 VAHTS^{TM} DNA Clean Beads（Vazyme Biotech，南京）。

Qubit2.0 荧光计（Invitrogen，美国），微型漩涡混合仪（上海沪西分析仪器厂），台式高速低温离心机（Thermo，美国），PCR 仪（BIO-RAD，美国），电泳

仪(北京市六一仪器厂)。

1.3 样品的采集

若蚜(nymph)的采集:将同一批初产烟蚜若蚜(1-4 龄各 25 头)置于一干净的离心管内,放入 -80℃ 冰箱中保存,待提取 RNA。无翅成蚜(apterous adult)的采集:将同一批 4 龄若蚜置于另一株无虫的健康烟株上,将烟株置于适宜饲养条件(温度: 25 ±1℃、相对湿度:60% ~70%、光周期 14L:10D)下待若蚜蜕皮形成成蚜,挑取 25 头 1 日龄无翅成蚜置于干净的离心管内,放入 -80℃ 冰箱中保存,待提取 RNA。有翅成蚜(winged adult)的采集:将同一批 4 龄若蚜置于另一株无虫的健康烟株上,将烟株置于适宜饲养条件(温度 25 ±1℃、相对湿度 60% ~70%、光周期 14L:10D)下待若蚜蜕皮形成成蚜,挑取 25 头 1 日龄有翅成蚜置于干净的离心管内,放入 -80℃ 冰箱中保存,待提取 RNA。

1.4 样品 RNA 的提取(Trizol 法)

将 1.3 节 3 组样品按照 RNA 提取的标准方法分别提取烟蚜若蚜、无翅成蚜和有翅成蚜样品的总 RNA,并进行 RNA 质量检测。合格后,将每组置于 -80℃ 冰箱中保存待用。

1.5 cDNA 文库的建立和转录组测序

利用 Qubit2.0 RNA 检测试剂盒对总 RNA 精确定量,以确定文库构建所加入总 RNA 的量,利用 Qubit2.0 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量,以便按照 1:1 的比例等量混合后在 Illumina HiSeq™2000 测序平台上进行测序。并对测序获得原始数据经过去除低质量片段,切除 reads 中含 N 序列后,获取纯净序列。具体参照 Wang 等(2012)研究方法。

1.6 不同虫态烟蚜差异基因表达分析

将试验获取的 Clean reads 转录组数据进行混合拼接,然后利用 FPKM 法计算每个 unigene 的表达量(Mortazavi *et al*., 2008; 吴小波等, 2014)。

在此基础上,参照 Audic 和 Claverie(1997)基于测序的差异基因检测方法,对若蚜、无翅成蚜和有翅成蚜差异表达基因进行筛选。最后采用 FDR 的方法对差异检验的 *P* 值作多重假设检验校正得到 *Q* 值,为了得到显著差异表达的基因,我们将筛选条件设为:*Q* 值 <0.001 且差异倍数|Fold change| >2。分析这些差异基因在 GO (Gene Ontology) 中的分布情况并阐明样本差异在基因功能上的体现,在 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库分析差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。

1.7 差异表达基因的荧光定量 PCR 验证

为了验证试验结果的可靠性,根据相关文献推测有翅型和无翅型烟蚜中差异表达基因与翅发育的关系,挑选与翅生长发育关系较密切的基因进行荧光定量 PCR 检测。按照 1.3 节样品采集方法分别重新采集样品(每个样品设 3 次生物学重复和 3 次技术重复),按照 1.4 节样品制备的方法(Trizol 法)制备 qPCR 验证试验样品。从转录组数据中挑选 8 个有关飞行和翅型发育的基因,分别为 *Bursicon* (*bur-α* 和 *bur-β*), *flightin* (*Fln*), *Wntless* (*Wnt*), *Distal-less* (*Dll*), *Decapentaplegic* (*Dpp*), Juvenile hormone epoxide hydrolase 基因(*JHEH*)和 Ecdysone receptor 基因(*EcR*),以 *β-actin* (GenBank 登录号: MF083568)为内参基因进行荧光定量 PCR。PCR 反应体系:iQ™ SYBR® Green Supermix 10 μL,正反向引物(10 μmol/L) 各 1 μL,cDNA 模板 1 μL,ddH_2O 7 μL。PCR 反应程序:95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 30 s, 55℃退火并延伸 30 s, 40 个循环;接着 65 ~95℃ 的溶解曲线。检测分析它们在若蚜、无翅成蚜和有翅成蚜中的相对表达量,最后利用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法(Livak and Schmittgen, 2001)计算相对表达量,以探讨这些基因与翅发育的关系。引物设计如表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Table 1 qPCR primers

引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequences
yg-Fln-F	AACCAGTTGAAGCTCCTAAACC
yg -Fln-R	AGTCGTCGTAGTAATTGCTCTG
yg-EcR-F	ACCTCGTCGTCATCTTCCTC
yg-EcR-R	GCTGCTGATGGTTGGTGTAG
yg-Wnt-F	CTGCTGTCGTCGGTGGTAAT
yg-Wnt-R	TAGGTGACTGTTCCAGGTAGAC
yg-Dpp-F	CGGCTACGACGCTTACTACT
yg-Dpp-R	GCATAGATATGGACGCCAACTG
yg-Dll-F	TAAGCGGTGTGCTGTTGATG
yg-Dll-R	CGGCTGGTATCTCCACTTTG
yg-Eh-F	AACATCACGACCGAAGTCATC
yg-Eh-R	CGAGTTCAGGTACGCTTGTC
yg-burs-αF	GTCATCCATGTTCTACAATAC
yg-burs-αR	CTTCTCGTTCACCACTCTC
yg-burs-βF	TGGTGACATAGCAGTGAAC
yg-burs-βR	GGATCGTAGCAATGTGTAAG
Actin-F	TGGTATCGTCTTGGATTCTG
Actin-R	TTAGGTAGTCGGTGAGATCA

1.8　数据统计分析

数据采用 Microsoft Excel 2007 进行数据处理,再用 SPSS16.0 软件进行单因素方差分析和多重比较。

2　结果

2.1　烟蚜转录组 Illumina 测序和序列组装

对烟蚜若蚜、无翅成蚜和有翅成蚜样品进行 Illumina HiSeq^{TM}2000 测序,将测序获得的原始数据(GenBank 登录号：SRR6112438，SRR6112436 和 SRR6112437)文件经 CASAVA 碱基识别(base calling)分析转化为原始测序序列(sequenced reads),我们称之为 raw data 或 raw reads,以 FASTQ(简称为 fq)文件格式存储,其中包含测序序列(reads)的序列信息以及其对应的测序质量信息;并使用 Trimmomatic 进行数据处理,过滤去杂(包括含有带接头、重复的和质量很低的序列),得到纯净的序列(表 2)。

表 2　烟蚜转录组数据分析

Table 2　Analysis of the transcriptome data of *Myzus persicae*

样本 Sample	所有 reads 数(bp) Total reads	所有碱基数(bp) Total base count	干净序列总数(bp) Total clean reads	干净核苷酸总数(bp) Total clean nucleotides	Q20	N 碱基比例(%) Proportion of N bases	GC 含量(%) GC content
有翅成蚜 Winged adult	48 594 342	7 289 151 300	48 217 182	6 905 539 640	94.003	0.002	47.485
若蚜 Nymph	64 720 056	9 708 008 400	64 331 519	9 229 450 304	94.428	0.002	42.525
无翅成蚜 Apterous adult	65 466 494	9 819 974 100	65 099 307	9 425 647 502	94.891	0.005	37.177

Q20：碱基质量在 20 以上的比例 Proportion of bases with the quality score over 20.

从表 2 中可以看出,经过测序获得总序列数为 48 594 342 ~ 65 466 494 bp 之间,其中干净序列数在 48 217 182 ~ 65 099 307 bp 之间,干净序列长度介于 6 905 539 640 ~ 9 425 647 502 bp 之间。碱基质量在 20 以上(Q20)的碱基比例均高于 94%,GC 含量比例为 37.177% ~47.485%之间(表 2)。对测序数据进行组装后分析表明(表 3),本研究获取的样品所有序列能组装成 145 200 条 Transcript 转录本序列,平均长度 742.45 bp,Transcript 的 N50 为 1 477 bp。将所得样品的 clean reads 数据 *de novo* 利用 Trinity 进行组装总共获得 128 065 条 unigenes 转录本序列,unigenes 的 N50 为 855 bp,平均长度 607.08 bp(表 3)。对最后组装出来的 unigene 进行长度分布统计,长度超过了 1 000 bp 共有 20 287 条(图 1)。

2.2　Unigene 功能注释

将 unigene 分别注释到 KOG, NR, NT, GO 和 KEGG 等数据库中,并分别对注释到每个库以及注释上的 unigene 数目进行统计。本实验总共获得 128 065 个 unigenes (表 4)。其中注释到 KOG, NR, NT, GO 和 KEGG 等数据库的结果分别是 27 755 (21.67%), 48 403 (37.8%), 48 359 (37.76%), 40 556 (31.67%) 和 19 995 (15.61%)。使用 NCBI Blast 将 unigene 基因序列与 NR 数据库进行同源性比对,取 E vlaue $< 1e^{-5}$ 和相似度 >30% 的比对结果,得到 unigene 的功能注释信息和同源物种信息(图 2)。结果显示,分别有 24.13%, 23.65% 和 9.06% 的基因与小家鼠 *Mus musculus*、豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 和麦双尾蚜 *Diuraphis noxia* 比对上,另外还有 23.93% 的未知基因(图 2)。

将这些 unigenes 在 KOG 数据库中进行分类,共分 26 类(图 3),其中最大群体是 R 类(一般功能预测),有 3 641 个基因,其次是 T, O, J 和 K 类(分别为"信号转导机制","蛋白质翻转和分子伴侣类","翻译、核糖体结构与生物起源"和"转录"),分别对应3 513, 2 644, 1 876 和 1 855 个基因(图 3)。

表 3　烟蚜转录组测序序列组装质量

Table 3　Assembly quality of *Myzus persicae* transcriptome

	总数 Total number	长度范围 Length range		N50 长度(bp) N50 length	最大长度(bp) Maximam length	最小长度(bp) Minimum length	总长度(bp) Total length	平均长度(bp) Mean length
		≥500 bp	≥1 000 bp					
转录本 Transcript	145 200	46 464	23 317	1 477	118 446	201	107 804 096	742.45
Unigene	128 065	33 844	14 164	855	118 446	201	77 745 381	607.08

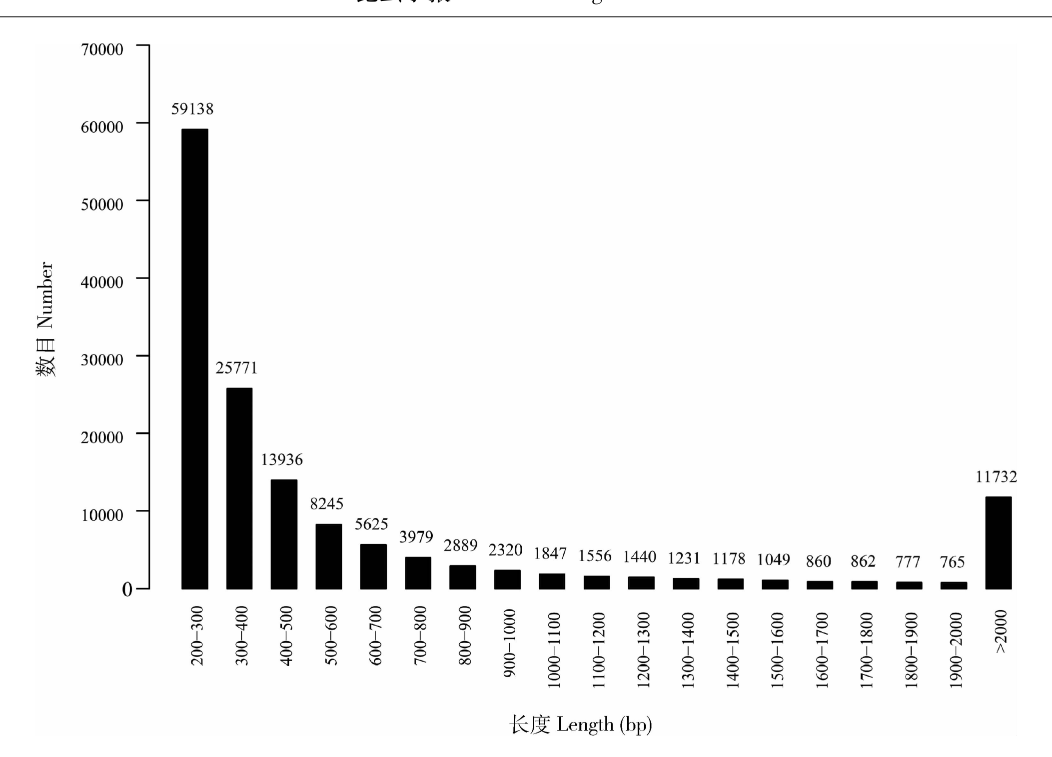


图 1　Transcript 和 unigene 长度分布

Fig. 1　Length distribution of transcripts and unigenes

表 4　烟蚜基因注释结果统计

Table 4　Annotation of unigenes of *Myzus persicae*

数据库 Database	注释的 unigenes 数目 Number of annotated unigenes	注释的 unigenes 百分比 Percentage of annotated unigenes
CDD	32 823	25.63
KOG	27 755	21.67
NR	48 403	37.8
NT	48 359	37.76
PFAM	28 714	22.42
Swiss-Prot	39 320	30.7
TrEMBL	48 953	38.23
GO	40 556	31.67
KEGG	19 995	15.61
在至少一个数据库中注释成功 Annotated in at least one database	64 766	50.57
在所有数据库中都注释成功 Annotated in all database	12 034	9.4
总基因数目 Total unigenes	128 065	100

进一步将注释到 GO 数据库中的 394 077 个 unigenes 分成生物学过程、细胞组分、分子功能三大类别，其中生物学过程分成 23 个类别，细胞组分分成 19 个类别，分子功能分成 20 个类别（图 4）。

2.3　烟蚜不同翅型中的差异表达基因

为了检测烟蚜不同虫态基因表达差异，我们分析了烟蚜若蚜、无翅成蚜和有翅成蚜中差异表达基因，具体差异数量如图 5 所示，从图中可以看出，有翅成蚜中上调表达的基因数目均比若蚜和无翅成蚜中多；无翅成蚜与若蚜相比，无翅成蚜中上调表达的基因数目要比若蚜中少。

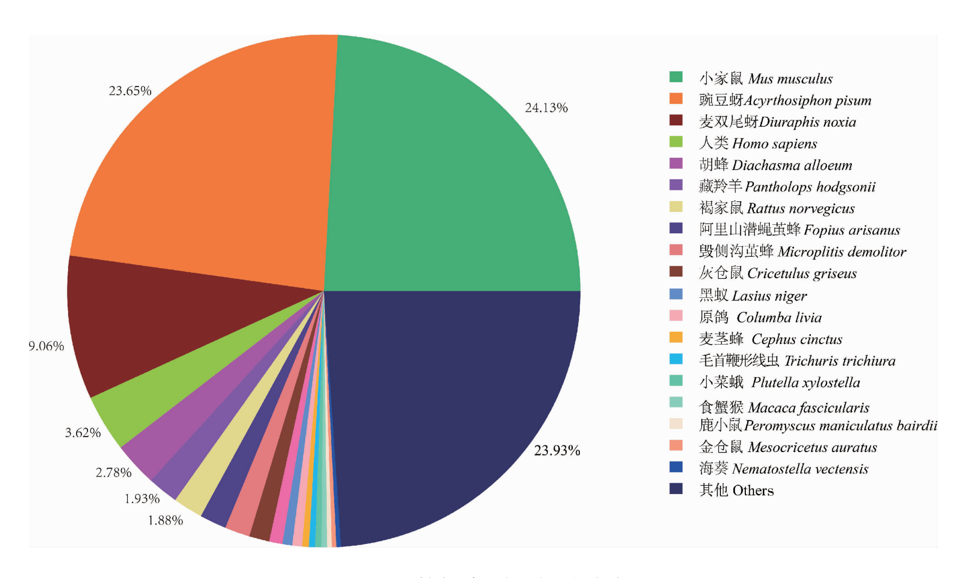


图 2　NR 数据库同源物种分类图

Fig. 2　Species distribution of homology search of unigenes against the NR database

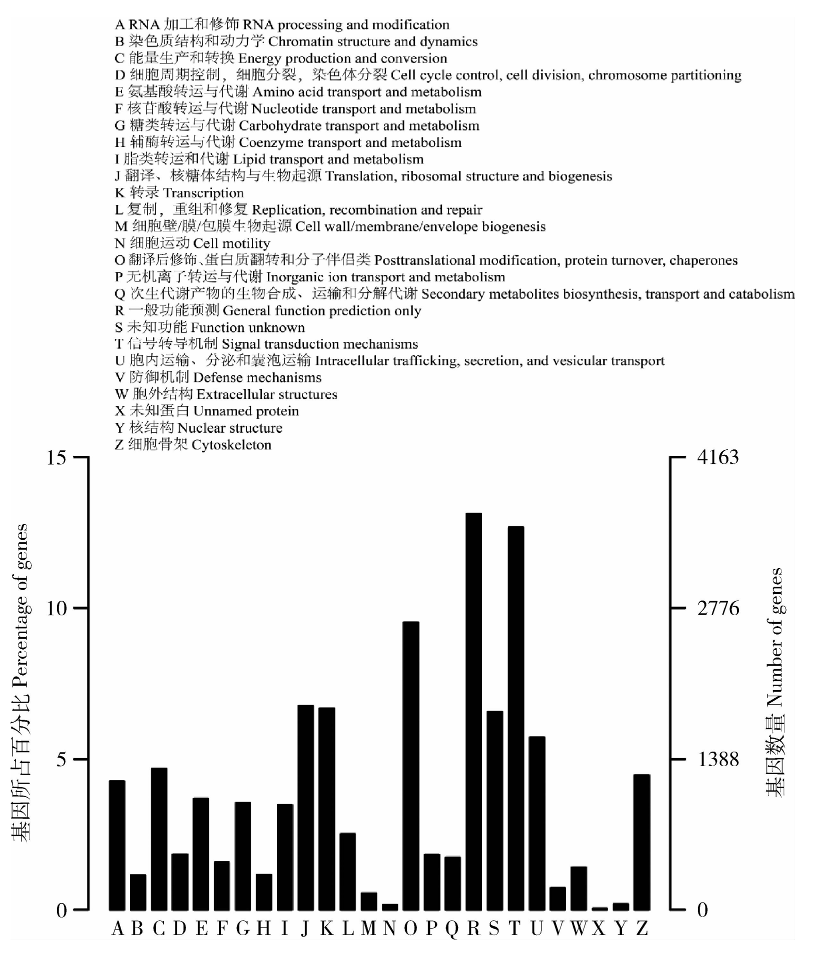


图 3　unigenes 的 KOG 分类图

Fig. 3　Clusters of orthologous groups (KOG) classification of the unigenes

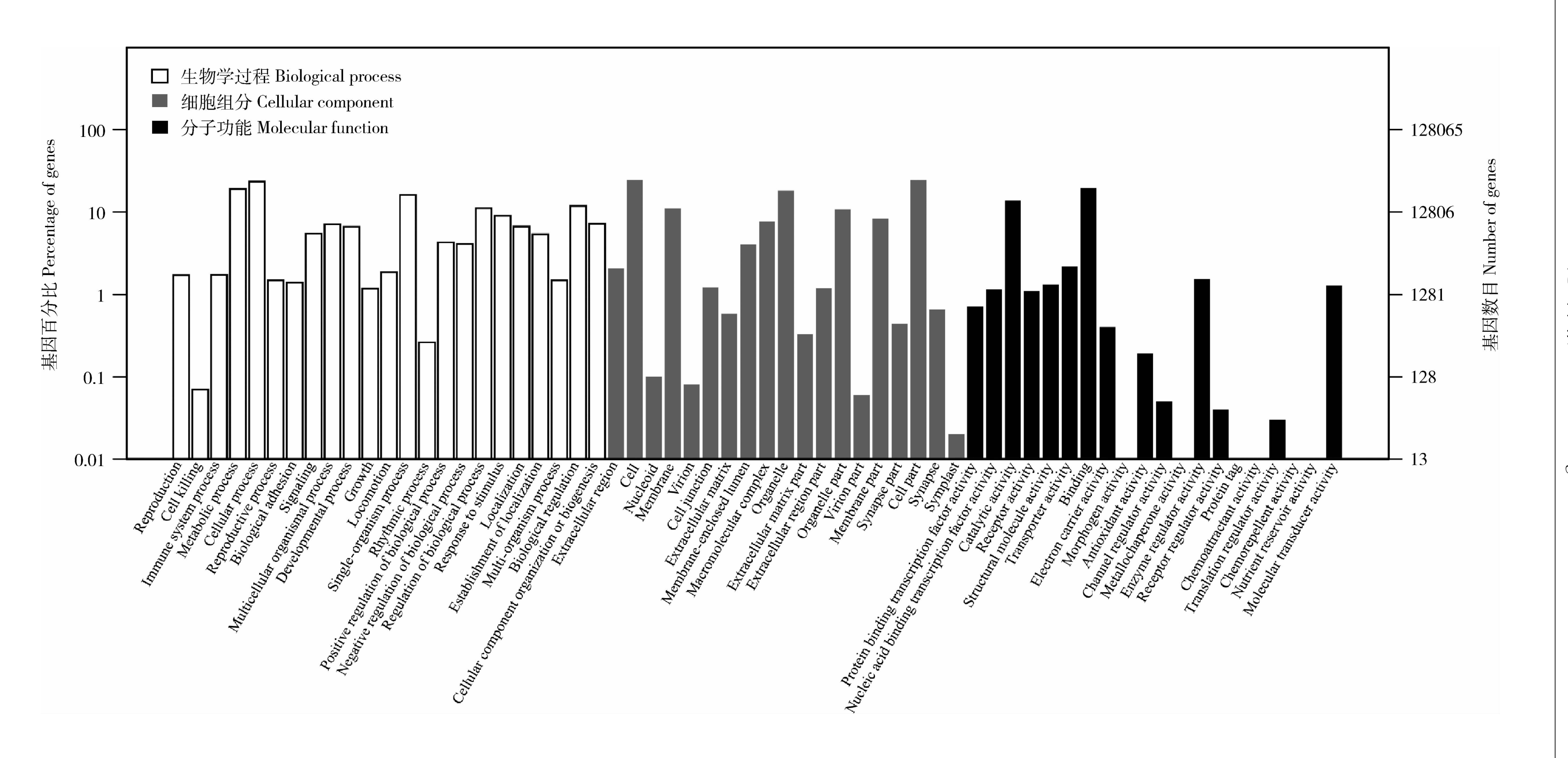


图 4 unigenes 的 GO 分布图

Fig. 4 Gene ontology classification of the unigenes

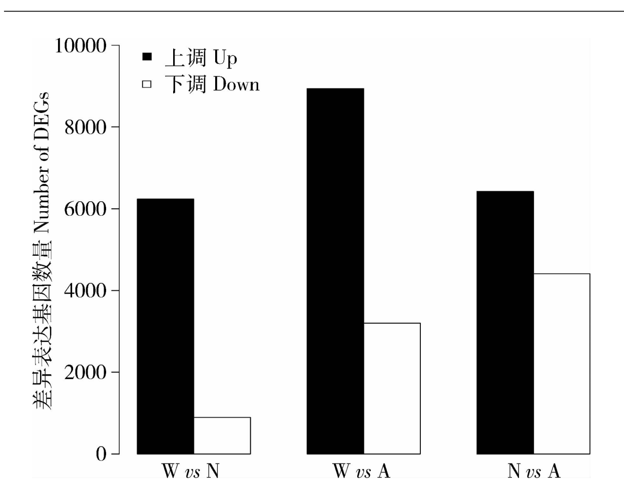


图 5　烟蚜若蚜、有翅成蚜和无翅成蚜间的差异表达基因数目

Fig. 5　Numbers of differentially expressed genes (DEGs) in nymphs, winged adults and apterous adults of *Myzus Persicae*

W *vs* N：有翅成蚜 *vs* 若蚜 Winged adult *vs* nymph；W *vs* A：有翅成蚜 *vs* 无翅成蚜 Winged adult *vs* apterous adult；N *vs* A：若蚜 *vs* 无翅成蚜 Nymph *vs* apterous adult.

比较有翅成蚜与若蚜发现，两个不同虫态存在 7 127 个差异基因，其中 6 230 个基因在有翅成蚜中上调，897 个基因下调，包括 52 个有关翅型生长发育的基因(其中 50 个上调，2 个下调)(表 5)和 23 个有关表皮生长的基因(其中 22 个上调，1 个下调)。有翅成蚜与无翅成蚜相比较，有 12 135 个基因存在差异表达，其中 8 938 个基因在有翅成蚜中上调表达，3 197 个基因下调表达，包括 66 个有关翅型生长发育的基因(其中 40 个上调，26 个下调)(表 6)和 35 个有关表皮生长的基因(其中 26 个上调，9 个下调)。若蚜与无翅成蚜相比，它们之间有10 829 个基因存在差异表达，其中在若蚜中上调表达的基因有 6 422 个，在若蚜中下调表达的基因有 4 407 个(表 7)。

2.4　差异表达基因的荧光定量 PCR 验证

从差异表达基因中选择了 8 个关于飞行和翅发育的基因在若蚜、无翅成蚜和有翅成蚜样品中进行 qPCR 验证。实验结果表明，Bursicon 基因(*bur-α* 和 *bur-β*)，Flightin 基因(*Fln*)，Wntless 基因(*Wnt*)，Distal-less 基因(*Dll*)，Decapentaplegic 基因(*Dpp*)，Juvenile Hormone Epoxide hydrolase 基因(*JHEH*)和 Ecdysone receptor 基因(*EcR*)基因在有翅成蚜体内表达量显著高于若蚜和无翅成蚜中，其中 *Fln* 基因表达差异最为显著，有翅成蚜中表达量是若蚜中的 3.34 倍，是无翅成蚜中的95.96 倍(图6)，与转录组结果一致。

3　讨论

本研究通过高通量测序技术对烟蚜若蚜、无翅成蚜和有翅成蚜的转录组差异进行了分析，获得烟蚜的转录组信息。测序结果发现，所有试验样本高质量的数据(Q20)均高于94%，说明测序质量较

表 5　烟蚜转录组中有翅成蚜与若蚜之间表达差异最显著的有关翅型发育的 12 个基因

Table 5　Top 12 differentially expressed genes (DEGs) in *Myzus persicae* transcriptome related to wing development between winged adults and nymphs

基因产物 Gene product	基因号 Gene ID	FPKM 值 FPKM value		有翅成蚜 *vs* 若蚜 Winged adult *vs* nymph	*P* 值 *P*-value
		有翅成蚜 Winged adult	若蚜 Nymph		
飞行蛋白 Flightin	c120195_g1	2 254.57	30.93	上调 Up	0.001
肌钙蛋白 C Troponin C	c122884_g1	509.38	82.59	上调 Up	0.001
鞣化激素 Bursicon	c25223_g1	30.61	14.05	上调 Up	0.001
MYM 型锌指蛋白 Zinc finger MYM-type	c86228_g1	706.26	17.07	上调 Up	0.001
胰岛素受体 Insulin receptor	c26217_g1	5.04	23.77	下调 Down	0.001
章鱼胺受体 β Octopamine receptor-beta	c14012_g1	20.14	8.82	上调 Up	0.001
G 蛋白偶联受体 1 G protein-coupled receptor 1	c25696_g1	7.98	29.94	下调 Down	0.001
翅极性蛋白 stan Wing polarity protein stan	c38442_g1	4.21	20.83	下调 Down	0.001
G 蛋白偶联受体 2 G protein-coupled receptor 2	c70240_g1	13.77	37.46	下调 Down	0.001
肌球蛋白重链 Myosin heavy chain	c20098_g1	4.49	25.52	下调 Down	0.001
无翅蛋白 Flightless	c36649_g1	4.44	34.23	下调 Down	0.001
肌球蛋白 5Myosin 5	c37942_g2	2.17	17.68	下调 Down	0.001

-：无差异 No difference. 表 6 和 7 同 The same for Tables 6 and 7.

表 6 转录组中有翅成蚜与无翅成蚜之间表达差异最显著的有关翅型发育的 12 个基因

Table 6 Top 12 differentially expressed genes (DEGs) in *Myzus persicae* transcriptome related to wing development between winged and apterous adults

基因产物 Gene product	基因号 Gene ID	FPKM 值 FPKM value		有翅成蚜 *vs* 无翅成蚜 Winged adult *vs* apterous adult	*P* 值 *P*-value
		有翅成蚜 Winged adult	无翅成蚜 Apterous adult		
飞行蛋白 Flightin	c120195_g1	2 254.57	0.44	上调 Up	0.001
肌钙蛋白 C Troponin C	c122884_g1	509.38	0	上调 Up	0.001
鞣化激素 Bursicon	c25223_g1	30.61	11.08	上调 Up	0.001
MYM 型锌指蛋白 Zinc finger MYM-type	c86228_g1	706.26	4.12	上调 Up	0.001
胰岛素受体 Insulin receptor	c26217_g1	–	–	–	
章鱼胺受体 β Octopamine receptor-beta	c14012_g1	20.14	4.86	上调 Up	0.001
G 蛋白偶联受体 1 G protein-coupled receptor 1	c25696_g1	7.98	17.02	下调 Down	0.001
翅极性蛋白 stan Wing polarity protein stan	c38442_g1	4.21	11.78	下调 Down	0.001
G 蛋白偶联受体 2 G protein-coupled receptor 2	c70240_g1	–	–	–	
肌球蛋白重链 Myosin heavy chain	c20098_g1	–	–	–	
无翅蛋白 Flightless	c36649_g1	4.44	17.53	下调 Down	0.001
肌球蛋白 5 Myosin 5	c37942_g2	2.17	9.22	下调 Down	0.001

表 7 转录组中若蚜与无翅成蚜之间表达差异最显著的有关翅型发育的 12 个基因

Table 7 Top 12 differentially expressed genes (DEGs) in *Myzus persicae* transcriptome related to wing development between nymphs and apterous adults

基因产物 Gene product	基因号 Gene ID	FPKM 值 FPKM value		若蚜 *vs* 无翅成蚜 Nymph *vs* apterous adult	*P* 值 *P*-value
		若虫 Nymph	无翅成蚜 Apterous adult		
飞行蛋白 Flightin	c120195_g1	30.93	0.44	上调 Up	0.001
肌钙蛋白 C Troponin C	c122884_g1	82.59	0	上调 Up	0.001
鞣化激素 Buesicon	c25223_g1	–	–	–	–
MYM 型锌指蛋白 Zinc finger MYM-type	c86228_g1	17.07	4.12	上调 Up	0.001
胰岛素受体 Insulin receptor	c26217_g1	23.77	8.21	上调 Up	0.001
章鱼胺受体 β Octopamine receptor-beta	c14012_g1	–	–	–	
G 蛋白偶联受体 1 G protein-coupled receptor 1	c25696_g1	580.83	65.17	上调 Up	0.001
翅极性蛋白 stan Wing polarity protein stan	c38442_g1	–	–	–	
G 蛋白偶联受体 2 G protein-coupled receptor 2	c70240_g1	37.46	17.48	上调 Up	0.001
肌球蛋白重链 Myosin heavy chain	c20098_g1	25.52	0.53	上调 Up	0.001
无翅蛋白 Flightless	c36649_g1	–	–	–	
肌球蛋白 5 Myosin 5	c37942_g2	–	–	–	

好。所有转录组测序获得的 reads 组装后，获取128 065个 unigenes，平均长度 607.08 bp，而且大部分 unigenes 能比对到亲缘关系较近的物种，这也说明测序组装质量较好。对有翅成蚜与若蚜及无翅成蚜差异表达基因进行分析，发现肽类激素和有关翅的生长发育的基因表达均存在差异，且与翅形成的相关基因显著富集，说明这些基因与烟蚜翅的发育和飞行相关。

Flightin 作为在间接飞行肌（indirect flight muscle，IFM）中特异表达的一种蛋白，1993 年首次在果蝇体内被鉴定出来（徐升胜等，2009）。研究表明，*flightin* 基因对于粗肌丝的组装和性能有重要意义，其对 IFM 发育和功能中必不可少（Vigoreaux and Perry，1994；Kronert *et al*.，1995；Henkin *et al*.，2004；Xue *et al*.，2010），可见 *flightin* 对昆虫的飞行具有重要作用。本研究结果显示，*flightin* 基因表达量在有翅成蚜中均高于无翅成蚜和若蚜，此研究结果与前人的研究结果一致（张小琴等，2013；Xue *et al*.，2013；何海芳等，2015）。由此可见 *flightin* 基因在昆虫翅的形成方面有着重要的作用。

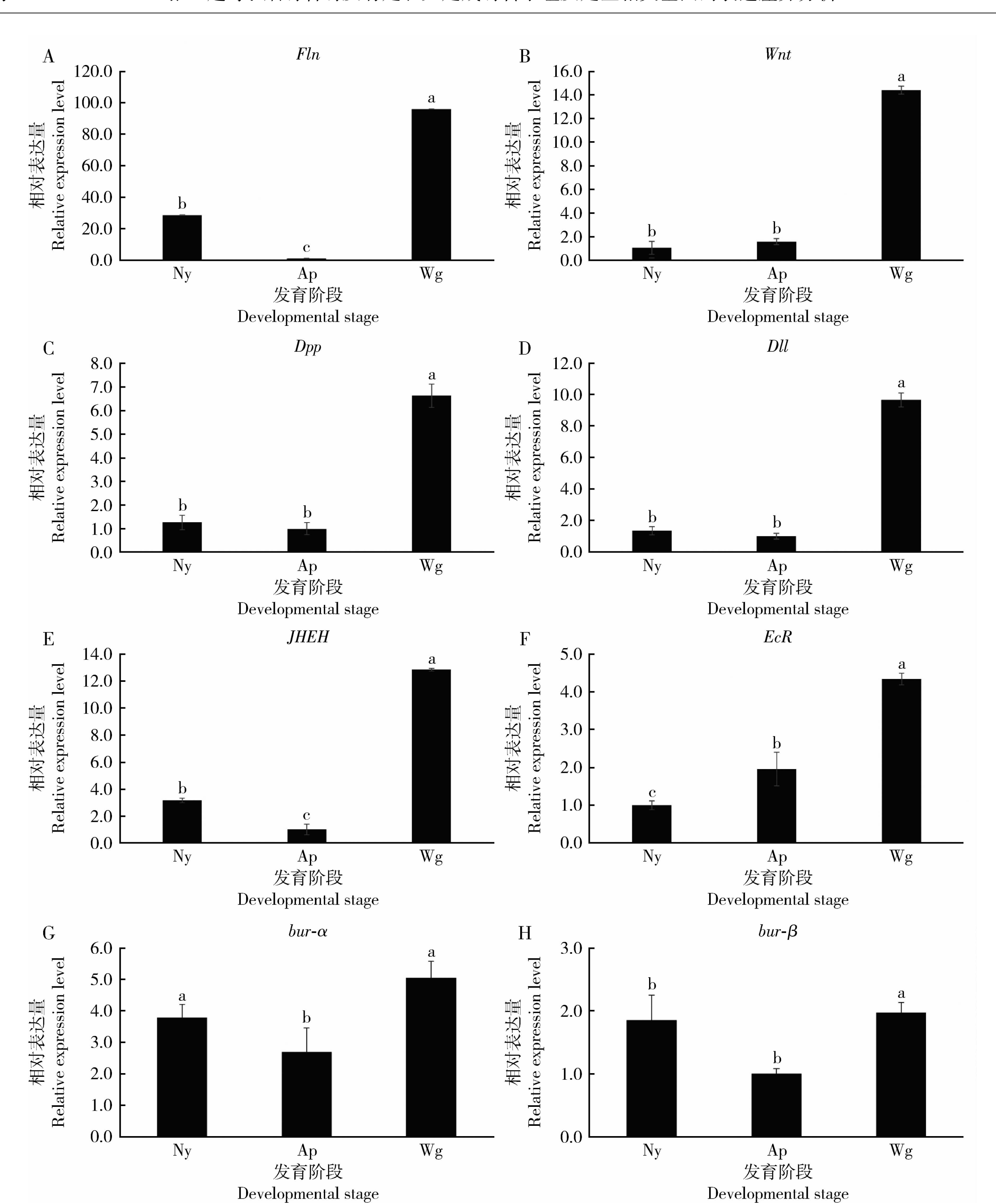


图 6　8 个基因在烟蚜若蚜、有翅成蚜和无翅成蚜中的表达量

Fig. 6　Expression levels of 8 genes in nymphs, winged adults and apterous adults of *Myzus persicae*

Ny：若蚜 Nymph；Ap：无翅成蚜 Apterous adult；Wg：有翅成蚜 Winged adult. 图中数据为平均值 ± 标准差，柱上不同字母表示差异显著(单因素方差分析，LSD，Duncan，$P<0.05$)。Data in the figure are mean ± *SD*. Bars with different superscripts differ significantly (one-way ANOVA, LSD, Duncan, $P<0.05$).

昆虫翅的发育模式主要由 3 个途径调控的，即前后轴(A-P)，代表基因有 *Engrailed* (*En*)，*Hedgehog* (*hh*)，*Decapentaplegic* (*Dpp*)等(Tabata *et al*., 1992；Basler and Struhl, 1994；Tabata and Kombert, 1994)，背腹轴(D-V)，代表基因有 *Apterous* (*Ap*)，*Wntless* (*Wnt*)，*Distal-less* (*Dll*)等(Cohen *et al*., 1992)，近远轴(P-D)，如 *Aristaless* 等基因(于居龙, 2014)。本实验从上述基因中随机挑选 3 个基

因进行验证,结果显示 *Wnt*, *Dll* 和 *Dpp* 在有翅成蚜中表达量具高于无翅成蚜和若蚜,并且表达量差异达到显著水平。该实验结果与 Brisson 等(2010)及 Abouheif 和 Wray(2002)的研究一致,可见此类基因对昆虫翅型的发育有着密切的联系。

保幼激素(juvenile hormone, JH)对昆虫变态及生殖等功能具有重要的调控作用(Riddiford, 1994; Wyatt and Davey, 1996)。昆虫在不同发育阶段保幼激素表达量的变化对昆虫变态和生殖具有必然的关系,例如保幼激素在昆虫成虫期保幼激素发挥独立和直接的作用,促进脂肪体的合成和生殖发育(Riddiford, 2013)。*JH* 调控昆虫的变态,保幼激素环氧水解酶(juvenile hormone epoxide hydrolase, JHEH)能降解保幼激素,本实验中有翅成蚜 *JHEH* 的表达量高于无翅成蚜,*JH* 是否对烟蚜翅发育具有调控作用还需我们进一步实验验证。

鞣化激素(bursicon, burs)是调节昆虫表皮硬化及展翅的激素类蛋白,它在昆虫表皮硬化和翅伸展过程中起着关键作用。初步研究发现有翅成蚜鞣化激素基因的表达量均高于若蚜和无翅成蚜,当鞣化激素基因受到干扰时,烟蚜的翅与表皮不能正常发育(张超等, 2017);与此同时我们还发现烟蚜蜕皮激素受体基因的表达量受到影响。Wu 等(2012)向灰飞虱 4 龄若蚜注射激素受体(ecdysone receptor, EcR)基因特异性 dsRNA 后发现,灰飞虱翅出现残缺,前后翅不能正常伸展,翅面不能正常黑化。在本实验中 *EcR* 在有翅成蚜中表达量也显著高于无翅成蚜和若蚜,所以我们推测 Burs 和 EcR 对调控烟蚜翅展及表皮着色有一定的关联;EcR 对烟蚜翅的伸展发育是否具有直接调控作用,是否与 Burs 有关?我们后续将进行相关实验的验证。

本研究利用高通量测序技术对烟蚜若蚜、无翅成蚜和有翅成蚜的转录组进行测序和分析,揭示了烟蚜发育成有翅成蚜时体内有关翅发育的基因的整体表达特征。初步研究发现,在烟蚜翅的发育过程中,关于翅的生长与发育的基因(鞣化激素基因)表达发生了明显的变化。该结果为深入研究烟蚜翅型分化机制以及相关基因功能及调控等奠定了一定的基础。

参考文献(References)

Abouheif E, Wray GA, 2002. Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants. *Science*, 297(5579): 249 – 252.

Anathakrishnan R, Sinha DK, Murugan M, Zhu KY, Chen MS, Zhu YC, Smith CM, 2014. Comparative gut transcriptome analysis reveals differences between virulent and avirulent Russian wheat aphids, *Diuraphis noxia*. *Arthropod-Plant Interact.*, 8(2): 79 – 88.

Audic S, Claverie JM, 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.*, 7(10): 986 – 995.

Basler K, Struhl G, 1994. Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature*, 368(6468): 208 – 214.

Brisson JA, Ishikawa A, Miura T, 2010. Wing development genes of the pea aphid and differential gene expression between winged and unwinged morphs. *Insect Mol. Biol.*, 19(S2): 63 – 73.

Cohen B, McGuffin ME, Pfeifle C, Segal D, Cohen SM, 1992. *apterous*, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Gen. Dev.*, 6(5): 715 – 729.

Costechareyre D, Chich JF, Strub JM, Rahbé Y, Condemine G, 2013. Transcriptome of *Dickeya dadantii* infecting *Acyrthosiphon pisum* reveals a strong defense against antimicrobial peptides. *PLoS ONE*, 8(1): e54118.

Devonshire AL, Fiel LM, Foster SP, Moores GD, Williamson MS, Blackman RL, 1998. The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Philos. Trans. R. Soc. B*, 353(1376): 1677 – 1684.

He HF, Zhang C, Zhang J, Yang L, Li WM, Wu ZJ, 2015. Polyclonal antibody preparation and application of *flightin* gene of *Nilaparvata lugens*. *China Sci. Paper*, 10(6): 724 – 727. [何海芳, 张超, 张洁, 杨靓, 李为民, 吴祖建, 2015. 褐飞虱 *flightin* 基因多克隆抗体的制备及应用. 中国科技论文, 10(6): 724 – 727]

Henkin JA, Maughan DW, Vigoreaux JO, 2004. Mutations that affect flightin expression in *Drosophila* alter the viscoelastic properties of flight muscle fibers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 286(1): C65 – C72.

Hu JJ, Meng X, Zhou JB, Yang LX, Liu SH, Li RZ, 2017. Transcriptome analysis of the cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Acta Entomol. Sin.*, 60(1): 9 – 17. [胡俊杰, 孟翔, 周佳滨, 杨陆兴, 刘善海, 李润钊, 2017. 扶桑绵粉蚧转录组分析. 昆虫学报, 60(1): 9 – 17]

Kronert WA , O'Donnell PT, Fieck A, Lawn A, Vigoreaux JO, Sparrow JC, Bernstein S, 1995. Defects in the *Drosophila* myosin rod permit sarcomere assembly but cause flight muscle degeneration. *J. Mol. Biol.*, 249(1): 111 – 125.

Liu XD, Zhai BP, Zhang XX, 2004. Advance in the studies of migration of aphids. *Entomol. Knowl.*, 41(4): 301 – 307. [刘向东, 翟保平, 张孝羲, 2004. 蚜虫迁飞的研究进展. 昆虫知识, 41(4): 301 – 307]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402 – 408.

Mortazavi A, Williams BA, Mccue K, Schaeffer L, Wold B, 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods*, 5(7): 621 – 628.

Qin HJ, Wang GF, 1996. Tobacco field aphids and virus diseases in

China. *Acta Tabac. Sin.*, 3(3): 75 - 78. [秦焕菊, 王桂芬, 1996. 我国烟田蚜虫与病毒病害. 中国烟草学报, 3(3): 75 - 78]

Riddiford LM, 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect Physiol.*, 24: 213 - 274.

Riddiford LM, 2013. Microarrays reveal discrete phases in juvenile hormone regulation of mosquito reproduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(24): 9623 - 9624.

Tabata T, Eaton S, Kornberg TB, 1992. The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Gen. Dev.*, 6(12b): 2635 - 2645.

Tabata T, Kornberg TB, 1994. Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell*, 76(1): 89 - 102.

Vigoreaux JO, Perry LM, 1994. Multiple isoelectric variants of flightin in *Drosophila* stretch-activated muscles are generated by temporally regulated phosphorylations. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 15(6): 607 - 616.

Wang K, Wang HY, Li Y, 2008. Research advance in wing polyphenism of aphids. *J. Anhui Agric. Sci.*, 36(20): 8671 - 8672. [王凯, 王海燕, 李宕, 2008. 蚜虫翅型分化研究进展. 安徽农业科学, 36(20): 8671 - 8672]

Wang ZL, Liu TT, Huang Z, Wu XB, Yan WY, Zeng ZJ, 2012. Transcriptome analysis of the Asian honey bee *Apis cerana cerana*. *PLoS ONE*, 7(10): e47954.

Wu WJ, Wang Y, Huang HJ, Bao YY, Zhang CX, 2012. Ecdysone receptor controls wing morphogenesis and melanization during rice planthopper metamorphosis. *J. Insect Physiol.*, 58(3): 420 - 426.

Wu XB, Wang ZL, Li SY, Gan HY, Liu H, Yan WY, Zeng ZJ, 2014. Transcriptomic analysis of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) queens and drones newly emerged and sexually matured. *Acta Entomol. Sin.*, 57(8): 905 - 913. [吴小波, 王子龙, 李淑云, 甘海燕, 刘浩, 颜伟玉, 曾志将, 2014. 羽化和性成熟时中华蜜蜂蜂王和雄蜂转录组分析. 昆虫学报, 57(8): 905 - 913]

Wyatt GR, Davey KG, 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormone II. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Adv. Insect Physiol.*, 26(8): 1 - 155.

Xu SS, Xu XK, Li B, Shen WD, 2009. Cloning of *flightin* gene in *Bombyx mori*. *China Sericult.*, 30(1): 13 - 16. [徐升胜, 许西奎, 李兵, 沈卫德, 2009. 家蚕 *flightin* 基因的克隆. 中国蚕业, 30(1): 13 - 16]

Xue J, Bao YY, Li BL, Cheng YB, Peng ZY, Liu H, Zhang CX, 2010. Transcriptome analysis of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *PLoS ONE*, 5(12): e14233.

Xue J, Zhang XQ, Xu HJ, Fan HW, Huang HJ, Ma XF, Zhang CX, 2013. Molecular characterization of the *flightin* gene in the wing-dimorphic planthopper, *Nilaparvata lugens*, and its evolution in pancrustacea. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 43(5): 433 - 443.

Yu JL, 2014. Clone of Wingless Gene in Rice Planthoppers and Its Function of Regulating Wing Forms in *Sogatella furcifera*. MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [于居龙, 2014. 稻飞虱 wingless 基因的克隆及其在白背飞虱翅型调控中的作用. 南京: 南京农业大学硕士学位论文]

Zhang C, Yang H, Yang MF, Yu HP, Zhang W, 2017. Cloning and expression analysis of Bursicon gene in *Myzus persicae* (Sulzer). *Fujian J. Agric. Sci.*, 32(11): 1244 - 1250. [张超, 杨洪, 杨茂发, 喻会平, 张伟, 2017. 桃蚜鞣化激素基因克隆与表达分析. 福建农业学报, 32(11): 1244 - 1250]

Zhang QL, Yuan ML, 2013. Progress in insect transcriptomics based on the next-generation sequencing technique. *Acta Entomol. Sin.*, 56(12): 1489 - 1508. [张棋麟, 袁明龙, 2013. 基于新一代测序技术的昆虫转录组学研究进展. 昆虫学报, 56(12): 1489 - 1508]

Zhang XQ, Hu YQ, Zhang CX, 2013. Prokaryotic expression of the *Nilaparvata lugens flightin* gene and its differential expression in different life stages. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 50(4): 1006 - 1012. [张小琴, 胡玉琼, 张传溪, 2013. 褐飞虱 *flightin* 的原核表达及其差异表达检测. 应用昆虫学报, 50(4): 1006 - 1012]

(责任编辑：马丽萍)